

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Pendekatan Penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian pre-eksperimen dengan menggunakan pendekatan kuantitatif. Penelitian ini akan meneliti kandungan vitamin C dan total asam organik pada kombucha teh daun *Morinda citrifolia* L dengan perlakuan variasi konsentrasi gula dan lama fermentasi.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang yang beralamat di Jalan Raya Tlogomas No.246, Malang. Waktu penelitian dilakukan pada tanggal 3-16 September 2019.

#### **3.3 Populasi dan Sampel**

##### **3.3.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah daun *Morinda citrifolia* L yang berdaun segar, diambil mulai dari daun ke-5 sampai ke-3 dari pangkal, berwarna hijau, dan tidak berlubang diperoleh di perkebunan UPT Materia Medica Batu.

##### **3.3.2 Sampel**

Sampel dalam penelitian ini adalah daun *Morinda citrifolia* L yang berdaun segar, diambil mulai dari daun ke-5 sampai ke-3 dari pangkal, berwarna hijau, dan tidak berlubang yang diambil sebanyak 1 kg.

### 3.3.3 Sampel size

Besar sampel dalam penelitian ini ditetapkan untuk menentukan jumlah pengulangan dalam penelitian (Federer, 1967) :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

Perhitungan :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(9-1)(r-1) \geq 15$$

$$(8)(r-1) \geq 15$$

$$8r - 8 \geq 15$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 3$$

Dengan demikian, banyaknya ulangan dalam penelitian ini adalah sebanyak 3 ulangan.

### 3.3.4 Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan adalah *simple random sampling*.

## 3.4 Variabel Penelitian

### 3.4.1 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kandungan vitamin C dan total asam organik.

### 3.4.2 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar gula (6%, 8%, 10%) dan lama fermentasi (9 hari, 11 hari, 13 hari). Hal ini didasari pada penelitian terdahulu yaitu pada penelitian Otace (2015) terhadap pengaruh variasi konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap pembuatan kopi kombucha. Dimana pada penelitian terdahulu menggunakan variasi konsentrasi gula 2%, 4%, 6%, 8% dan lama fermentasi 5 hari, 7 hari, 9 hari, dan 11 hari. Dengan perlakuan optimal pada perlakuan konsentrasi gula 8% dan lama fermentasi 11 hari.

### 3.4.3 Variabel kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jumlah teh daun *Morinda citrifolia* L, konsentrasi stater, dan suhu ruangan.

## 3.5 Definisi Operasional Variabel

1. Lama fermentasi mempengaruhi kandungan vitamin C dalam teh kombucha. Semakin lama fermentasi, maka vitamin C yang terdapat pada kombucha akan semakin meningkat (Apriani, 2017). Uji kadar vitamin C menggunakan metode titrasi idimetri.
2. Asam organik adalah komponen umum dalam makanan dan minuman, dan memainkan peran penting dalam karakteristik produk, seperti rasa dan aroma. Total asam pada teh kombucha menentukan cita rasa teh kombucha sekaligus merupakan salah satu penentu mutu produk (Ardheniati, 2018). Uji total asam organik menggunakan metode titrasi asam basa.

3. Konsentrasi gula. Gula dalam proses fermentasi kombucha berperan sebagai substrat untuk pertumbuhan sel dan pembentukan produk (asam asetat) (Ardheniati, 2018).
4. Lama fermentasi mempengaruhi kadar vitamin C (mg/100mL) dan total asam (%) dalam teh kombucha (Cahyaningtyas, 2018).

### 3.6 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 2 pola faktorial, yaitu faktor 1 adalah konsentrasi gula (G) dengan 3 variasi, yaitu G6 (6%), G8 (8%), G10 (10%) dan faktor 2 adalah lama fermentasi (F) dengan 3 variasi, yaitu F9 (9 hari), F11 (11 hari), F13 (13 hari). Penelitian dilakukan dengan 3 kali ulangan. Banyak unit eksperimen dalam RAL faktorial sebanyak 27 ragam unit eksperimen. Adapun kombinasi perlakuan dalam penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 3.1**

**Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan**

Konsentrasi gula	Lama fermentasi		
	F1	F2	F3
G6	G6F9	G6F11	G6F13
G8	G8F9	G8F11	G8F13
G10	G10F9	G10F11	G10F13

Keterangan :

G6F9 : Konsentrasi gula 6%, lama fermentasi 9 hari

G6F11 : Konsentrasi gula 6%, lama fermentasi 11 hari

G6F13 : Konsentrasi gula 6%, lama fermentasi 13 hari

G8F9 : Konsentrasi gula 8%, lama fermentasi 9 hari

- G8F11 : Konsentrasi gula 8%, lama fermentasi 11 hari
- G8F13 : Konsentrasi gula 8%, lama fermentasi 13 hari
- G10F9 : Konsentrasi gula 10%, lama fermentasi 9 hari
- G10F11 : Konsentrasi gula 10%, lama fermentasi 11 hari
- G10F13 : Konsentrasi gula 10%, lama fermentasi 13 hari

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Tahap Persiapan

Tahap awal yang dilakukan yaitu menyiapkan alat dan bahan.

##### 1. Alat Yang Digunakan

- a. Alat yang digunakan dalam pembuatan kombucha teh daun *Morinda citrifolia* L adalah oven, kompor, loyang, sendok/pengaduk, panci *stainless steel*, saringan, pisau, timbangan analitik, gelas ukur, termometer, gelas kaca 330 ml, serbet, dan karet gelang.
- b. Alat yang digunakan dalam pengujian vitamin C adalah erlenmeyer 100 ml, pipet tetes, gelas ukur 100 ml, dan labu ukur 100 ml.
- c. Alat yang digunakan dalam pengujian total asam organik adalah timbangan analitik, labu ukur 100 ml, labu ukur 1000 ml, erlenmeyer 100 ml, erlenmeyer 250 ml, pipet tetes, pipet volume 25 ml, gelas ukur 100 ml, corong gelas, botol semprot, buret, klem, dan statis.

##### 2. Bahan Yang Digunakan

- a. Bahan yang digunakan dalam pembuatan kombucha teh daun *Morinda citrifolia* L adalah daun *Morinda citrifolia* L 1 kg, air, starter cair

kombucha, dan kultur starter kombucha SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), gula pasir, dan kertas label.

- b. Bahan yang digunakan dalam pengujian vitamin C adalah aquades, iodium 0,01 N, kalium iodida, indikator amilum 1%.
- c. Bahan yang digunakan dalam pengujian total asam organik adalah aquades, asam asetat glasial, indikator *phenolptalein* (pp) 1% dan larutan NaOH 0,1 N.

### 3.7.2 Tahap Pelaksanaan

Tahap pelaksanaan terdiri dari penyiapan teh daun *Morinda citrifolia* L dan pembuatan kombucha teh daun *Morinda citrifolia* L :

#### 1. Penyiapan teh daun *Morinda citrifolia* L

Penyiapan teh daun *Morinda citrifolia* L terdiri dari proses pengambilan, pensortiran, dan pengeringan. Berikut proses pengolahan daun *Morinda citrifolia* L menjadi teh :

- a. Pemilihan daun *Morinda citrifolia* L dengan kriteria daun berwarna hijau, tidak berlubang dan segar
- b. Pemetikan daun *Morinda citrifolia* L, dilakukan dengan cara memotong pada bagian tangkai agar tidak rusak dan layu
- c. Daun *Morinda citrifolia* L dicuci bersih, disortasi, dan pemotongan tangkainya
- d. Layukan daun *Morinda citrifolia* L dengan cara merendam dalam air mendidih (suhu 100 °C) selama 30-40 detik
- e. Potong kecil-kecil daun *Morinda citrifolia* L hingga berukuran 1-2 cm<sup>2</sup>

- f. Didiamkan selama 5 menit
  - g. Daun *Morinda citrifolia* L diperas sampai air di dalam daun tidak keluar
  - h. Daun *Morinda citrifolia* L disangrai sampai tidak keluar uap untuk mengeluarkan aroma, mempercepat proses pengeringan, dan menghindari kontaminasi jamur
  - i. Daun *Morinda citrifolia* L dioven dengan suhu 50°C selama 30-60 menit (Saragih, 2014).
2. Pembuatan Kombucha Teh Daun *Morinda citrifolia* L
- a. Air sebanyak 6 liter direbus dengan suhu 90°C di dalam panci stainless sampai mendidih lalu memasukkan serbuk daun *Morinda citrifolia* L sebanyak 90 gram dan biarkan selama 3 menit
  - b. Ampas teh daun *Morinda citrifolia* L disaring hingga menyisakan air seduhan teh daun *Morinda citrifolia* L
  - c. Air seduhan teh ditambahkan gula sesuai perlakuan, yaitu 6%, 8%, dan 10%
  - d. Air seduhan teh daun *Morinda citrifolia* L yang telah diberi gula diaduk hingga tercampur dan masukkan 200 ml teh daun *Morinda citrifolia* L ke dalam gelas kaca
  - e. Teh daun *Morinda citrifolia* L didinginkan sampai suhu kurang lebih 25°C. Waktu pendinginan tidak lebih dari 4 jam
  - f. Setelah teh dingin ditambahkan starter kombucha cair 10% dari total teh yang digunakan dan SCOBY dengan berat 10% b/v dari volume total teh yang digunakan
  - g. Gelas kaca ditutup dengan serbet kemudian diikat dengan karet

- h. Teh kombucha daun *Morinda citrifolia* L difermentasikan sesuai perlakuan, yaitu selama 9 hari, 11 hari, dan 13 hari di dalam suhu ruang (29°C) dan tidak terkena cahaya matahari

### 3.7.3 Tahap Pengamatan

#### 1. Uji Kadar Vitamin C

Dalam penelitian ini, uji kadar vitamin C menggunakan metode titrasi iodometri. Langkah-langkah untuk melakukan pengujiannya sebagai berikut :

- Iodium diambil sebanyak 1,29 gram ditambah KI 1,8 gram lalu masukkan ke dalam gelas beker 250 ml. Tambah aquades hingga larut
- Masukkan larutan iodine ke dalam labu takar 100 ml, tambahkan aquades hingga tanda batas dan homogenkan
- Masukkan larutan iodine ke dalam botol reagen gelap
- 25 ml teh kombucha diambil dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml
- Aquades ditambahkan hingga tanda batas dan dihomogenkan
- Diambil 10 ml sampel lalu masukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml
- Ditambah 2 ml larutan indikator amilum 1% dititrasi dengan iodium 0,01 N sampai bewarna biru
- Cara pemakaian larutan iodium 0,01 N, yaitu :

1 ml iodium = 0,88 mg asam askorbat (vitamin C)

Adapun panduan perhitungan kandungan vitamin C menurut Apriani (2017) adalah sebagai berikut :

$$\text{Vitamin C mg/100 mL} = \frac{A \times 0,88 \times 100 \times FP}{W}$$



Keterangan :

A = ml yodium yang dipakai untuk titrasi

FP = Faktor pengenceran

W = berat contoh

## 2. Uji Kadar Total Asam Organik

Pengujian total asam organik menggunakan metode titrasi asam basa.

Langkah-langkah untuk mengukur total asam (%) adalah sebagai berikut :

### a. Standarisasi NaOH (Saputra, 2015)

1. Larutan NaOH 0,1 M dibuat dengan cara ditimbang kristal NaOH sebanyak 4 gram lalu dimasukkan dalam labu ukur 1000 ml kemudian dilarutkan dengan akuades sampai tanda batas labu ukur
2. Larutan standar asam asetat 0,1 M dibuat dengan cara mengambil larutan asam asetat glasial sebanyak 0,5 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan
3. Asam asetat yang sudah homogen dipindahkan ke dalam erlenmeyer 250 ml
4. Ditambah 2-3 tetes indikator *phenolptalein* (*pp*) kemudian dititrasi dengan larutan NaOH hingga terbentuk warna merah muda yang bertahan selama 15 detik
5. Normalitas NaOH dihitung dengan rumus :

$$N (\text{NaOH}) = \frac{\text{Massa } \text{CH}_3\text{COOH} \times n \text{ CH}_3\text{COOH} \times 1000}{V \text{ titran} \times \text{Mr } \text{CH}_3\text{COOH}}$$

b. Pengukuran kadar total asam (Yenrina, 2015 dalam Haryanto, 2018)

1. 10 ml kombucha teh daun *Morinda citrifolia* L diambil dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml
2. Akuades ditambahkan ke dalam labu ukur sampai tanda batas lalu homogenkan
3. Teh kombucha diambil sebanyak 50 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu tambahkan 3 tetes indikator *phenolptalein* (pp)
4. Sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai warna menjadi merah muda. Pembacaan skala pada saat warna menjadi merah muda. Pembacaan skala pada saat warna merah muda terbentuk yang pertama kali dan bertahan selama 15 detik

$$\% \text{ total asam} = \frac{V \text{ titran} \times N \text{ titran} \times BE \text{ asam asetat} \times P}{V \text{ sampel} \times 1000} \times 100 \%$$

Keterangan :

- V titran = jumlah larutan NaOH untuk titrasi (ml)  
 N titran = normalitas NaOH (0,1 N)  
 BE = berat ekuivalen asam asetat (60)  
 P = faktor pengenceran  
 V sampel = volume sampel yang digunakan

### 3.8 Teknik Pengumpulan Data

Teknik yang digunakan dalam pengumpulan data :

a. Studi kepustakaan

Studi pustaka merupakan langkah awal dalam metode pengumpulan data.

Studi pustaka merupakan metode pengumpulan data yang diarahkan

kepada pencarian data dan informasi melalui dokumen-dokumen, baik dokumen tertulis, foto-foto, gambar, maupun dokumen elektronik yang dapat mendukung dalam proses penulisan (Sugiyono, 2011).

b. Analisis laboratorium (Uji laboratorium)

Uji laboratorium yang dilakukan untuk meneliti kandungan vitamin C dan total asam organik pada kombucha teh daun *Morinda citrifolia* L. Kandungan vitamin C diteliti dengan uji titrasi iodiometri sedangkan total asam organik diteliti dengan uji titrasi.

**Tabel 3.2 Data hasil penelitian kadar vitamin C**

Lama fermentasi	Kadar vitamin C kombucha teh daun <i>Morinda citrifolia</i> L. (mg/100mL)		
	G6	G8	G10
F9			
F11			
F13			

**Tabel 3.3 Data hasil penelitian total asam organik**

Lama fermentasi	Total asam organik kombucha teh daun <i>Morinda citrifolia</i> L. (%)		
	G6	G8	G10
F9			
F11			
F13			

(Apriani, 2017)

### 3.9 Teknik Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan variasi konsentrasi gula dan lama fermentasi kombucha teh daun *Morinda citrifolia* L terhadap kadar vitamin C dan total asam organik dapat menggunakan analisis data *two-way* ANOVA (*Analysis of Variance*), kemudian jika terdapat perbedaan yang nyata akan dilakukan uji

DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) pada taraf signifikan ( $\alpha$ ) 5% untuk mengetahui perlakuan yang berbeda.

Sebelum melakukan uji *two-way* ANOVA (*Analysis of Variance*), terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Analisis data ini menggunakan IBM SPSS statistics 22.

a. Uji normalitas

Pada uji kenormalan data menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov yang bertujuan untuk mengetahui data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak.

Interpretasi data untuk uji Kolmogorov-Smirnov :

1. Jika nilai Sig. Kolmogorov-Smirnov  $> 0,05$  maka data berdistribusi normal
2. Jika nilai Sig. Kolmogorov-Smirnov  $< 0,05$  maka data tidak berdistribusi normal.

b. Uji homogenitas

Uji homogenitas variansi sangat diperlukan sebelum kita membandingkan dua kelompok atau lebih, agar perbedaan yang ada bukan disebabkan oleh adanya perbedaan data dasar (ketidakhomogenan kelompok yang dibandingkan) (Irianto, 2004). Dalam penelitian ini uji homogenitas menggunakan uji Levene.

Pada uji Levene, data di transformasikan dengan jalan mencari selisih masing-masing skor dengan rata-rata kelompoknya. Adapun dasar pengambilan keputusan dalam uji homogenitas adalah sebagai berikut :

1. Jika nilai signifikansi (Sig.)  $> 0,05$  maka varian variabel terikat adalah sama atau homogen

2. Jika nilai signifikansi (Sig.) < 0,05 maka varian variabel terikat tidak sama atau heterogen

c. Uji *two-way* ANOVA (*Analysis of Variance*)

Uji ini digunakan bertujuan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan (perbedaan yang bermakna) pada nilai rata-rata dari beberapa kelompok data. Asumsi yang harus dipenuhi dalam melakukan uji *two-way* ANOVA :

1. Nilai standardized residual harus berdistribusi normal.
2. Populasi-populasi dari varian data adalah sama atau homogen.
3. Sampel yang digunakan tidak berhubungan satu sama lain.
4. Data bebas dari pengaruh variabel yang tidak diteliti.

Interpretasi data untuk uji *two-way* ANOVA :

1. Jika nilai signifikansi (sig.) < 0,05 maka ada perbedaan rata-rata dari dua atau lebih populasi
2. Jika nilai signifikansi (sig.) > 0,05 maka tidak ada perbedaan rata-rata dari dua atau lebih populasi

Hipotesis dalam ANOVA dua arah terdiri dari :

1. Yang berkaitan dengan pengaruh faktor pertama (A), atau efek kolom

$$H_0 : \mu_{A1} = \mu_{A2}$$

Tidak ada perbedaan yang nyata antara rata-rata hitung dari kategori kolom

$$H_1 : \mu_{A1} \neq \mu_{A2}$$

Ada perbedaan yang nyata antara rata-rata hitung dari kategori kolom

2. Yang berkaitan dengan pengaruh faktor kedua (B), atau efek baris

$$H_0 : \mu_{B1} = \mu_{B2}$$

Tidak ada perbedaan yang nyata antara rata-rata hitung dari kategori baris

$$H_1 : \mu_{B1} \neq \mu_{B2}$$

Ada perbedaan yang nyata antara rata-rata hitung dari kategori baris

3. Interaksi B x A

$H_0$  : efek faktor A tidak tergantung pada faktor B, dan efek faktor B juga tidak tergantung pada faktor A

$H_1$  : efek faktor A tergantung pada faktor B, dan efek faktor B juga tergantung pada faktor A (Irianto, 2004).

- d. Uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*)

Uji Duncan didasarkan pada sekumpulan nilai beda nyata yang ukurannya semakin besar, tergantung pada jarak di antara pangkat-pangkat dari dua nilai tengah yang dibandingkan. Uji ini dilakukan untuk menentukan atau memilih perlakuan terbaik atau paling efektif dari sejumlah perlakuan dengan berdasar pada nilai rerata. Dapat digunakan untuk menguji perbedaan diantara semua pasangan perlakuan yang mungkin tanpa memperlihatkan jumlah perlakuan.